

平成15年度

修士論文要旨

先端生命科学専攻

平成16年2月16日(月)～18日(水)

柏キャンパス 新領域生命棟 講義室

東京大学大学院新領域創成科学研究科

改変 cargo receptor の細胞内局在性の解析

学生証番号 16531

医薬デザイン工学分野

瀧森陽子

【背景】

レクチンとは、植物、動物、微生物等に存在するタンパク質または糖タンパク質の内、糖に対する特異的結合活性を持った物質の総称である。植物レクチンは認識する糖が異なる様々なレクチンが存在し、長いこと糖を特定する道具として使われてきた。細胞内の糖タンパク質分泌経路において *cis* Golgi と小胞体 (ER) 間をリサイクルしている ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) -53 とトランスゴルジネットワーク (TGN) から形成される輸送小胞の膜タンパク質と VIP (vesicular integral protein) 36 はそれぞれの糖認識領域のアミノ酸配列がマメ科レクチンと高い相同性を示すことから、VIP36 と ERGIC-53 がレクチン活性を有し、そのレクチン活性が糖タンパク質の選別輸送に機能していることが推定されている。当研究室において VIP36 のマンノース特異性の糖認識領域をマメ科レクチンでシアル酸特異性を持つ *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) またはガラクトース結合性の *Bauhinia purpurea* lectin (BPA) との同領域と置き換え、認識する糖タンパク質が変化することを試みた (MAH/VIP36、BPA/VIP36)。この組み換え体をを用いて当研究室においてレクチン染色による western blotting や FACS の結果から組み換え体が組み換えた糖認識領域の特異性の糖を認識し、細胞表面まで移行していると考えられる結果を得た。一方で MAH/VIP36 は細胞表面での発現が見られなかった。これらの結果に基づき、私の研究ではゴルジのマーカータンパク質である β COP と共に組み換え体の染色を行い細胞内局在を可視化することにした。一方、ERGIC-53 は C 末端領域に輸送シグナル KKFF が存在し、2つのリジンは ERGIC から小胞体への回帰シグナルとされ、2つのフェニルアラニンが小胞体を出発するシグナルとされている。このシグナル配列の部分を小胞体やトランスゴルジネットワークへ局在することが知られている UDPGT HP1、*furin*、TGN38、CI-MPR のシグナル配列と置き換え、局在が変化することを試みた。この局在の変化についてもゴルジのマーカータンパク質である β COP と共に組み換え体の染色を行い、細胞内局在を可視化した。

【実験方法】

FLAG-tag のついた VIP36 の組み換え体 FLAG/VIP36 (VF6')、FLAG/MAH/VIP36 (MF20)、FLAG/BPA/VIP36 (BF18) を間接蛍光抗体法により染色し、FACS により細胞表面での発現を調べた。更に、ゴルジのマーカータンパクである β COP を用いて間接蛍光抗体法により組み換え体との二重染色を行い細胞内の局在を可視化した。また、Myc-tag のついた ERGIC-53 の組み換え体 (Myc/ERGIC-53/UDPGT HP1、Myc/ERGIC-53/furin、Myc/ERGIC-53/TGN38、Myc/ERGIC-53/CI-MPR) についても同様にゴルジのマーカータンパク質である β COP との二重染色を間接蛍光抗体法により行った。

【結果・考察】

FACS で解析すると VF6' と BF18 は細胞表面での発現が見られたが、MF20 は発現が見られなかった。VIP36 は過剰発現すると細胞膜での発現が見られることが報告されているので MF20 の結果は興味深い。間接蛍光抗体法による β COP と VIP36 の組み換え体との二重染色では BF18 は β COP と一致し、VF6' と MF20 は β COP と一部重なりその近辺に局在した。共焦点顕微鏡による観察では MF20 はゴルジの一部分に存在し、BF18 もゴルジに集積していた。トランスゴルジにおいてガラクトースやシアル酸の付加は行われるため、トランスゴルジに集積している可能性が考えられる。または糖認識領域の置換によりそのリサイクリングに変化を起こしたかもしれない。

ERGIC-53 の組み換え体についてはどの組み換え体についても β COP と重なりが見られ、Myc/ERGIC-53、Myc/ERGIC-53/TGN は核周辺に散在したが、Myc/ERGIC-53/CI は細胞質に広がって存在した。Myc/ERGIC-53/CI は置き換えたシグナル配列により局在が変化したと思われる。

どちらの組み換え体もトランスゴルジマーカーを用いた間接蛍光抗体法、さらには免疫電子顕微鏡を用いた詳細な解析といったさらなる検討が必要である。

Abstracts of the Theses for Master's Degree

February 16-18, 2006

Kashiwa Campus of the University of Tokyo

Yohko Takimori

Title: Analysis of Intracellular Localization of Modified Cargo Receptors

Summary

The mannose lectin ERGIC-53 operates as a cargo receptor in transport of glycoproteins from ER to *cis* Golgi and the homologous lectin VIP36 may operate in quality control of glycosylation in the Golgi. These lectins function as chaperones and sorting receptors in the secretory pathway. The sequence similarity between VIP36 and ERGIC-53 is exist in the carbohydrate recognition domain that shows homology to leguminous lectins. In my research, carbohydrate recognition domain of VIP36 was replaced with that of sialic acid-binding lectin *Masackia amurensis* hemagglutinin(MAH) or that of galactose-binding lectin *Bauhinia purpurea* lectin(BPA) and attached FLAG-tag. The result from FACS of recombinant VIP36 showed that FLAG/VIP36 and FLAG/BPA/VIP36 expressed at the cell surface but FLAG/MAH/VIP36 didn't. The study of localization of recombinant VIP36 with immunofluorescence staining viewed with fluorescence microscopy showed that FLAG/MAH/VIP36 occupied one part of Golgi apart from nuclear on apical side and FLAG/BPA/VIP36 stained Golgi more widely whose pattern was different from FLAG/VIP36. Stained region of Golgi in FLAG/MAH/VIP36 expressing cell. was probably *trans* Golgi because adding sialic acid to glycoproteins occurs in *trans* Golgi. Because lectin form oligomer, MF20 catching sialic acids remained monomer and could't move. Immunoprecipitation and SDS-PAGE to investigate oligomer state,

immunofluorescence staining with *trans* Golgi marker and immunoelectron microscopy method will provide more information.

And signal motifs KKFF in cytoplasmic domain of ERGIC-53 attached Myc-tag was replaced with that of UDPGT HP1 or furin or TGN38 or CI-MPR that localizes to ER or *trans* Golgi network. Immunofluorescence staining of recombinant ERGIC-53 showed that Myc/ERGIC-53 and Myc/ERGIC-53/TGN38 localized nuclear periphery. Myc/ERGIC-53/CI-MPR localized apart from nuclear and spread over except nuclear. There is a possibility that transport of Myc/ERGIC-53/CI-MPR was influenced by the signal motif of CI-MPR and localized *trans* Golgi network. Among recombinant ERGIC-53, Myc/ERGIC-53/CI-MPR will transport glycoproteins most efficiently. Localization compared with CI-MPR by immunofluorescence staining and expression at cell surface by immunoelectron microscopy are required.